



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102013018658-9 A2

(22) Data do Depósito: 22/07/2013

(43) Data da Publicação: 10/11/2015  
(RPI 2340)



(54) **Título:** MÉTODO E KIT DE DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS ASSOCIADAS A DISTÚRBIOS NEURODEGENERATIVOS

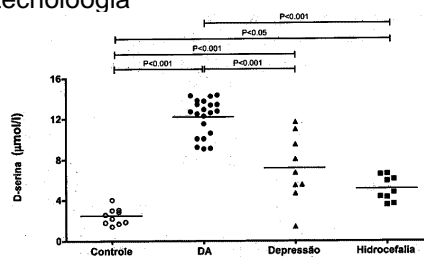
(51) **Int. Cl.:** G01N 33/68; G01N 30/00; A61K 39/395; G01N 33/53

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ

(72) **Inventor(es):** ROGÉRIO ARENA PANIZZUTTI, SERGIO TEIXEIRA FERREIRA, CAROLINE MADEIRA MOREIRA

(74) **Procurador(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ

(57) **Resumo:** MÉTODO E KIT DE DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS ASSOCIADAS A DISTÚRBIOS NEURODEGENERATIVOS. A invenção aqui descrita apresenta um novo método de diagnóstico e monitoramento da progressão de doenças neurodegenerativas, particularmente da doença de Alzheimer. O método se baseia na determinação de um novo biomarcador no líquido cefalorraquidiano de um paciente, a D-serina, que em determinados níveis caracteriza uma doença específica. É também objeto da presente invenção, um kit para diagnóstico de doenças associadas a distúrbios neurodegenerativos. A presente invenção se situa nos campos da química e biotecnologia



### **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

## **MÉTODO E KIT DE DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS ASSOCIADAS A DISTÚRBIOS NEURODEGENERATIVOS**

### **Campo da Invenção**

5           A presente invenção refere-se a um método de detecção de biomarcadores do líquido cefalorraquidiano. Particularmente, a invenção revela a aplicação de um biomarcador em um método de diagnóstico de doenças neurodegenerativas, particularmente a doença de Alzheimer. A presente invenção se situa nos campos da química e biotecnologia.

10

### **Antecedentes da Invenção**

Os avanços da medicina e dos cuidados de saúde elevam a esperança de vida e diminuem a taxa de mortalidade, refletindo assim um estágio de desenvolvimento social. No entanto, o aumento da expectativa de vida também  
15       traz custos onerosos, como um aumento substancial de doenças relacionadas ao envelhecimento, de caráter neurodegenerativo, dentre as quais é possível citar a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington, depressão nervosa, amnésia, transtorno obsessivo-compulsivo, degeneração espinocerebelar, esclerose lateral amiotrófica, Esclerose múltipla, Leucodistrofia,  
20       degeneração de Machado Joseph, doença de Pick entre outras.

Principalmente nos países de baixo e médio rendimento, a doença de Alzheimer e outras demências são estigmatizadas como decorrentes do processo normal de envelhecimento. A falta de percepção da doença de Alzheimer como uma condição médica prejudica o diagnóstico e posterga o  
25       início do tratamento, que muitas vezes só vem a ocorrer em fases muito avançadas da doença.

A doença de Alzheimer é uma doença multifatorial, resultando em vários sintomas, o que conseqüentemente pode vir a prejudicar o processo de diagnóstico e reconhecimento da doença. Atualmente o diagnóstico da doença  
30       decorre da avaliação clínica e só pode ser confirmado com análise histológica do cérebro *post-mortem*.

De acordo com Hampel et al, 2008, o diagnóstico da doença pode ser complementado com o uso de biomarcadores no fluido cefalorraquidiano, como  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ 42), proteína tau total (T-tau) e proteína tau hiperfosforilada (P-tau). No entanto, segundo McKhann et al, 2011, os resultados podem ser  
5 ambíguos ou imprecisos.

Estudos sobre a doença relacionam a patologia com a neurotoxicidade mediada por receptores de glutamato do subtipo N-metil-D-aspartato (receptores NMDA) (Chohan et al, 2006). Assim, a memantina, um antagonista dos receptores NMDA, é aprovada para uso clínico em pacientes com doença de  
10 Alzheimer moderada a severa (Lipton, 2005; McKeage, 2009).

Os estudos de Mustafa et al, 2005 e Shleper et al, 2005, sugerem que a D-serina, um co-agonista dos receptores NMDA, está relacionada com a neurotoxicidade mediada pelos receptores NMDA. A liberação aumentada de D-serina foi encontrada em modelos experimentais de doença de Alzheimer e pode  
15 contribuir para a neurotoxicidade mediada pelo receptor NMDA (Brito-Moreira et al, 2011; Wu et al, 2007; Wu et al, 2004).

Fisher et al. observaram um aumento nos níveis de D-serina no líquido cefalorraquidiano recolhido *post-mortem* de dez indivíduos acometidos pela doença de Alzheimer em comparação com cinco indivíduos-controle (Fisher et al, 1998). Por outro lado, vários estudos com amostras de tecido cerebral *post-mortem* obtidas de números reduzidos de indivíduos observaram níveis similares de D-serina entre portadores da doença de Alzheimer e controles (Chouinard et al, 1993; Kumashiro et al, 1995; Nagata et al, 1995). Em comum, estes estudos  
20 não avaliaram níveis de D-serina em diferentes fases da doença de Alzheimer e a sua associação com outros biomarcadores, e utilizaram análises *post-mortem* que não são úteis para o diagnóstico in vivo.

Hashimoto et al. (2004) realizaram um estudo para determinar se os níveis de D-serina e L-serina no sangue em pacientes com doença de Alzheimer eram alterados em comparação com os níveis no sangue de controles normais.  
30 Os autores não encontraram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos. As medições neste estudo foram realizadas a partir do sangue e não

a partir do líquido cefalorraquidiano e os autores não propõem métodos para avaliar a progressão do distúrbio relacionado à doença degenerativa.

De acordo com Fuchs, S. (2010), a D-serina vem sendo relacionada a condições neurodegenerativas agudas e crônicas. Aponta que a patogênese de tais condições está relacionada à excitotoxicidade provocada pela superestimulação do receptor NMDA. Adicionalmente, revela métodos de análise de L-serina e D-serina, que consistem em técnicas cromatográficas de separação quiral (cromatografia a gás e líquida), combinadas com detecção por espectrometria de massa para determinar as concentrações de D-serina e outros aminoácidos em fluidos biológicos, como o líquido cefalorraquidiano. Sugere que as concentrações de D-aminoácidos podem auxiliar no processo de diagnóstico, além de prover novos alvos terapêuticos para tratamento dos distúrbios relacionados. No entanto, não revela um método que relacione as concentrações de D-serina obtidas de um fluido biológico com um método de diagnóstico clínico, como, por exemplo, a escala de avaliação clínica de demência CDR, além de não sugerir meios para avaliar a progressão do distúrbio associado a doença neurodegenerativa.

Foram realizadas buscas no âmbito patentário a fim de encontrar documentos publicados que foquem em métodos de diagnóstico da doença de Alzheimer.

O documento US2005221348 revela uma coleção de marcadores bioquímicos presentes no soro de pacientes, os quais são alterados em pacientes com doença de Alzheimer, e podem ser usados, em conjunto com avaliação da função cognitiva, para diagnosticar, auxiliar no diagnóstico e/ou medir a progressão da doença de Alzheimer em pacientes. O documento US2005221348 não revela a utilização específica de D-serina como biomarcador para diagnosticar ou medir o progresso da doença de Alzheimer em pacientes.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo que a D-serina pudesse ser utilizada num método de diagnóstico e método de monitoramento de progressão da doença de Alzheimer e outras demências associadas.

Assim, resta na técnica a necessidade de se encontrar um método preciso para auxiliar o diagnóstico clínico da doença e agregar qualidade de vida ao processo de envelhecimento.

## 5 **Sumário da Invenção**

A invenção aqui descrita apresenta um novo método de diagnóstico e monitoramento da progressão de doenças neurodegenerativas, particularmente da doença de Alzheimer. O método se baseia em um novo biomarcador do líquido cefalorraquidiano de um paciente, a D-serina, que em determinados  
10 níveis caracteriza uma doença específica.

É um objeto da presente invenção um método de diagnóstico de doenças associadas a distúrbios neurodegenerativos compreendendo:

- detecção de concentração de D-Serina em líquido cefalorraquidiano.

Em uma realização preferencial, o método compreende adicionalmente  
15 associação da concentração de D-Serina detectada a um valor na escala CDR.

Em uma realização preferencial, o líquido cefalorraquidiano é coletado por punção lombar entre as vértebras L3 e L4 ou L4 e L5.

Em uma realização preferencial, o método compreende a detecção de D-serina realizada por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
20 (HPLC).

Em uma realização preferencial, o método adicionalmente compreende nova detecção de concentração de D-Serina em líquido cefalorraquidiano em período t posterior e estabelecimento de relação matemática entre a primeira medição e segunda medição.

25 Em uma realização preferencial, o método compreende adicionalmente pelo menos uma nova medição e pelo menos um novo estabelecimento de relação matemática entre a medição atual e pelo menos uma medição prévia.

Em uma realização preferencial, o método provê diagnóstico de doenças associadas a distúrbios neurodegenerativos, sendo pelo menos uma  
30 dentre as seguintes: doença de Parkinson, doença de Huntington, doença de Alzheimer, depressão, amnésia, transtorno obsessivo-compulsivo,

degeneração espinocerebelar, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, leucodistrofia, doença de Machado Joseph e doença de Pick.

Em uma realização preferencial, o método provê diagnóstico de doenças associadas a distúrbios neurodegenerativos em que a doença é

5 doença de Alzheimer.

É também objeto da presente invenção um kit para diagnóstico de doenças associadas a distúrbios neurodegenerativos, compreendendo pelo menos um meio de coleta de líquido cefalorraquidiano e pelo menos um meio de detecção de concentração de D-Serina.

10 Em uma realização preferencial, o Kit compreende adicionalmente um meio de associação da concentração de D-Serina detectada a um padrão CDR.

Em uma outra realização preferencial, a detecção de D-serina ocorre por metodologias de imunoensaio selecionados do grupo consistindo de: testes imunoenzimáticos, testes quimioluminescentes,

15 eletroquimioluminescentes, radioimunoensaios e combinações entre estes.

Em mais uma outra realização preferencial, a detecção de D-serina ocorre pela metodologia imunoenzimática ELISA.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão

20 descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

### **Descrição das figuras**

A figura 1 apresenta a relação dos níveis de D-serina no LCR de diferentes grupos. As linhas horizontais representam o valor médio para cada

25 grupo de diagnóstico. Pontos de dados mostram os valores individuais. A significância estatística é determinada por ANOVA de uma via seguida por ajuste de Bonferroni para comparações múltiplas. DA, Doença de Alzheimer.

A figura 2 apresenta relação entre os níveis de D-serina e CDR. As linhas horizontais representam o valor médio para cada grupo. Pontos de

30 dados mostram os valores individuais. A significância estatística é determinada por ANOVA de uma via seguida por ajuste de Bonferroni para grupos

selecionados de CDR: 0,5, 1, 2 e 3 versus CDR 0. CDR, Escala de Demência Clínica.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

5           Conforme previamente descrito, um dos aspectos da presente invenção é um novo método de diagnóstico e monitoramento da progressão de doenças neurodegenerativas, que compreende quantificação dos níveis de um novo biomarcador do líquido cefalorraquidiano, D-serina.

10           O método de diagnóstico de doenças associadas a distúrbios neurodegenerativos compreende detecção de concentração de D-Serina em líquido cefalorraquidiano. Preferencialmente, compreende ainda a associação da concentração de D-Serina detectada a um valor da escala CDR.

15           Preferencialmente, o líquido cefalorraquidiano é coletado por punção lombar entre as vértebras L3 e L4 ou L4 e L5 e, preferencialmente, a detecção é realizada por meio de cromatografia HPLC.

            Adicionalmente, quando não há possibilidade de se coletar o líquido cefalorraquidiano das vértebras lombares, coleta-se o líquido de outras regiões do corpo humano como, por exemplo, das cisternas liquóricas.

20           Adicionalmente, a detecção da D-serina pode ser realizada utilizando-se outros métodos analíticos conhecidos na técnica, como, por exemplo: cromatografia gasosa, cromatografia gasosa de alta resolução, cromatografia líquida clássica, cromatografia supercrítica, cromatografia de acordo com a fase estacionária, cromatografia de acordo com o modo de separação (por adsorção, por partição, por troca iônica, por afinidade, dentre outros).

25           A presente invenção também apresenta um kit de diagnóstico de doenças associadas a distúrbios neurodegenerativos que compreende pelo menos um meio de coleta de líquido cefalorraquidiano e pelo menos um meio de detecção de concentração de D-Serina. Preferencialmente, o kit apresenta ainda um meio de associação da concentração de D-Serina detectada a um  
30           padrão CDR.

### **Escala de Dêmemcia Clínica (CDR)**

No contexto da presente invenção, o termo “escala de Demência Clínica (CDR)” deve ser entendido um meio de classificar diversos graus de demência.

#### **Estabelecimento de Relação Matemática**

5 No contexto da presente invenção, o termo “estabelecimento de relação matemática” deve ser entendido como a utilização de qualquer operação ou operador matemático para estabelecer uma relação entre duas funções.

#### **Realização Preferencial**

O método de diagnóstico de doenças associadas a distúrbios neurodegenerativos compreende preferencialmente as etapas de:

- 10
1. Coleta de amostras do líquido cefalorraquidiano, através de punção lombar, preferencialmente no espaço entre as vértebras L3 e L4 ou L4 e L5;
  2. Quantificação de D-serina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

15 Em uma realização preferencial, o método compreende adicionalmente associação numérica da concentração de D-Serina detectada a um valor da escala CDR.

Em uma realização preferencial, para indivíduos com valor de D-serina detectada superior a 8  $\mu\text{mol/L}$ , o valor da escala CDR é pelo menos 0,5.

20 Em uma realização preferencial, o método adicionalmente compreende nova detecção de concentração de D-Serina em líquido cefalorraquidiano em período  $t$  posterior e estabelecimento de relação matemática entre a primeira medição e segunda medição.

25 O método compreende adicionalmente pelo menos uma nova medição e pelo menos um novo estabelecimento de relação matemática entre a medição atual e pelo menos uma medição prévia, possibilitando monitoramento da progressão da doença.

30 Em uma realização preferencial, o método provê diagnóstico de doenças associadas a distúrbios neurodegenerativos, sendo pelo menos uma dentre doença de Parkinson, doença de Huntington, doença de Alzheimer, depressão, amnésia, transtorno obsessivo-compulsivo, degeneração espinocerebelar, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, leucodistrofia,



doença de Machado Joseph e doença de Pick, dentre outras doenças associadas a distúrbios neurodegenerativos.

Em uma realização preferencial, o método provê diagnóstico de doenças associadas a distúrbios neurodegenerativos em que a doença é a  
5 doença de Alzheimer.

Um outro objeto da presente invenção é um Kit para diagnóstico de doenças associadas a distúrbios neurodegenerativos, compreendendo pelo menos um meio de coleta de líquido cefalorraquidiano e pelo menos um meio de detecção de concentração de D-Serina.

10 Em uma realização preferencial, a detecção de D-serina ocorre por metodologias de imunoensaio selecionados do grupo consistindo de: testes imunoenzimáticos, testes quimioluminescentes, eletroquimioluminescentes, radioimunoensaios e combinações entre estes.

Em uma realização preferencial, o Kit compreende uma placa de 96  
15 poços, um anticorpo para D-serina, um anticorpo secundário e um leitor de placas para metodologias de teste imunoenzimático como, por exemplo, ELISA.

Em uma realização preferencial, o Kit compreende adicionalmente um meio de associação da concentração de D-Serina detectada a um padrão CDR.

20 Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo, sem limitar o escopo da mesma.

Exemplo 1: Investigação dos níveis de D-serina no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com possibilidade de ter doença de  
25 Alzheimer

Foi analisado o nível de D-serina em 4 grupos de pacientes:

O grupo 1 foi composto por 21 pacientes com doença de Alzheimer, recrutados do Centro da Doença de Alzheimer do Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IPUB/UFRJ), diagnosticados de  
30 acordo com os critérios do NINCDS e DSM-IV.

O grupo 2 foi composto por 9 pacientes diagnosticados com depressão de acordo com os critérios do DSM-IV.

O grupo 3 foi composto por 9 pacientes diagnosticados com hidrocefalia de acordo com o CID-10, recrutados do laboratório Neurolife, no Rio de Janeiro.

O grupo 4 foi o grupo controle, composto por 10 indivíduos saudáveis.

Critério de inclusão para todos os grupos foi idade superior a 60 anos.

Critério de exclusão para todos os grupos foi consumo excessivo de cigarros (mais de 10 maços por ano) e consumo excessivo de álcool.

As características gerais de cada grupo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Características demográficas, clínicas e marcadores LCR dos pacientes

	Controle	DA	Depressão	Hidrocefalia	Estatísticas
Idade, anos	70.7 (6.3)	72.1 (8.4)	69.8 (5.8)	74.6 (7.4)	0.71 (0.55)
Sexo, masculino/feminino	2/8	9/12	0/9	5/4	5.90 (0.01)*
Educação, anos	7.9 (5.1)	4.8 (4.8)	2.7 (2.6)	7.6 (5.7)	2.66 (0.06)
MEEM	27.1 (1.3)	12.7 (6.2) <sup>a</sup>	24.4 (2.2)	27.2 (1.8)	39.66 (0.0001)*
Duração da doença (meses)	N.A.	44.8 (28.2)	N.A.	24.7 (13.6)	N.A.
IATl	1.95 (0.40)	0.74 (0.34) <sup>b</sup>	1.58 (0.62)	1.67 (0.56)	18.29 (0.0001)*

MEEM (Mini Exame do Estado Mental), questionário de 30 pontos para avaliar perdas cognitivas. IATl (*INNOTEST amyloid tau index*), pontuação que combina os níveis de Aβ42 e T-tau, apontado como um biomarcador do LCR que auxilia no diagnóstico de doença de Alzheimer (DA) (Hustaert et al, 1999; Tabaraud et al, 2012)

Os valores da tabela 1 são apresentados como médias (desvio padrão). Significância estatística é dada por ANOVA de 1 via, F (valor p), seguido por ajuste Bonferroni para comparações múltiplas, exceto para sexo, o qual é dado por um teste de  $\chi^2$  (valor p). Asteriscos indicam diferença significativa. As características individuais de cada paciente encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Características de cada paciente submetido a análise de LCR.

Paciente No/Idade (anos)/Sexo	CDR	Duração da doença (anos)	Educação (anos)	MEEM	Medicados atualmente	Diagnóstico clínico
C1/62/F	0	N.A.	16	27	N.A.	Controle
C2/77/M	0	N.A.	6	27	N.A.	Controle
C3/65/M	0	N.A.	9	29	N.A.	Controle
C4/76/M	0	N.A.	2	26	N.A.	Controle
C5/67/F	0	N.A.	16	28	N.A.	Controle
C6/73/F	0	N.A.	11	27	N.A.	Controle
C7/71/F	0	N.A.	6	26	N.A.	Controle
C8/72/F	0	N.A.	4	27	N.A.	Controle
C9/81/F	0	N.A.	7	25	N.A.	Controle
C10/63/F	0	N.A.	2	29	N.A.	Controle
A1/64/F	2	4.2	0	4	C	DA
A2/78/M	2	8.2	4	10	R	DA
A3/61/F	3	1.5	4	9	No	DA
A4/80/M	2	7.5	12	18	R	DA
A5/65/M	3	3	16	9	Mem and Ris	DA
A6/79/F	2	3.5	8	14	R and T	DA
A7/72/F	3	9	0	3	R, Ris, B and Cl	DA
A8/68/M	2	4	4	11	D	DA
A9/83/F	1	5	5	22	R	DA
A10/68/M	2	3	2	14	R, Ris and Cl	DA
A11/77/F	2	3.5	4	11	R and Mem	DA
A12/71/M	2	1.5	2	16	No	DA
A13/82/F	2	1.8	0	17	D	DA
A14/59/F	1	7	16	23	R, Mem and Ris	DA
A15/80/F	2	3	0	15	D and Ris	DA
A16/75/M	1	3	1	23	Mem and Cl	DA
A17/61/F	2	1.2	4	13	Ris	DA
A18/70/M	3	2	4	3	R, Mem, E and Ris	DA
A19/78/F	1	1.5	3	16	Mem and R	DA
A20/58/M	3	3.5	8	3	D and Mir	DA
A21/85/F	2	1.5	4	13	D, Ris and Cl	DA
D1/63/F	0	N.A.	4	26	Fl and Cl	Depressão
D2/74/F	0.5	N.A.	4	25	Desv	Depressão
D3/65/F	0.5	N.A.	1	25	P	Depressão
D4/77/F	0	N.A.	8	26	Bus and Cl	Depressão
D5/63/F	0.5	N.A.	0	24	S	Depressão
D6/74/F	0.5	N.A.	4	24	Fl	Depressão
D7/64/F	0.5	N.A.	1	26	V and Cl	Depressão
D8/73/F	0.5	N.A.	0	19	No	Depressão
D9/75/F	0.5	N.A.	2	25	C	Depressão
H1/71/M	0	2	8	27	N.A.	Hidrocefalia
H2/81/F	0	1	10	28	N.A.	Hidrocefalia
H3/68/F	0	3	12	29	N.A.	Hidrocefalia
H4/78/M	0	2	12	25	N.A.	Hidrocefalia
H5/74/F	0	4	2	29	N.A.	Hidrocefalia
H6/66/M	0	3	0	29	N.A.	Hidrocefalia
H7/66/M	0	0.5	0	28	N.A.	Hidrocefalia
H8/80/F	0	1	8	25	N.A.	Hidrocefalia
H9/87/M	0	2	16	25	N.A.	Hidrocefalia

CDR, Avaliação Clínica da Demência. MEEM, Mini Exame do Estado Mental. DA, Doença de Alzheimer. F, Feminino; M, Masculino. NA, Não Aplicável. C, Citalopram, R, Rivastigmina, Mem, memantina, Ris, Risperidona, T, Trazodona, B, Biperideno, Cl, Clonazepam, D,

Donepezil, E, Escitalopram; Mir, Mirtazapina; Fl, fluoxetina; Desv, a desvenlafaxina, P, paroxetina, Bus, Buspirona; S, sertralina, V, venlafaxina.

Foram coletadas amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) através de punção lombar entre as vértebras L3-4 ou L4-5, e imediatamente armazenadas em congelador à temperatura de -80°C. Todas as punções lombares foram realizadas por volta de 11h da manhã.

A análise dos níveis de aminoácidos (D-serina e L-serina) no LCR foi realizada através de HPLC.

Os resultados obtidos encontram-se na descritos na Tabela 3 e representados graficamente na Figura 1.

Tabela 3 – Níveis dos aminoácidos nas amostras de LCR

	Controle	DA	Depressão	Hidrocefalia	ANOVA F (valor p)
D-serina (μmol/l)	2.45 (0.80)	12.22 (1.78) <sup>a</sup>	7.14 (3.28) <sup>b</sup>	5.08 (1.22) <sup>c</sup>	68.79 (0.0001)*
L-serina (μmol/l)	27.52 (9.28)	30.86 (4.99)	35.75 (11.68)	29.27 (13.15)	1.40 (0.26)
Serina total (μmol/l)	29.97 (9.02)	43.07 (4.22) <sup>d</sup>	42.88 (11.24) <sup>e</sup>	34.36 (12.43)	6.70 (0.001)*
Taxa D-ser/serina total	0.09 (0.04)	0.29 (0.05) <sup>f</sup>	0.17 (0.09) <sup>g</sup>	0.17 (0.08)	24.36 (0.0001)*

Valores são apresentados como médias (desvio padrão). DA, doença de Alzheimer.

Significância estatística é dada por ANOVA de 1 via seguido por ajuste Bonferroni para comparações múltiplas. Asteriscos indicam diferença significativa.

Os níveis de D-serina em pacientes com provável doença de Alzheimer foram 5 vezes maiores do que o grupo saudável, e duas vezes maiores do que nos grupos Depressão e Hidrocefalia (Tabela 3 e Figura 1). Os níveis de D-serina nos Grupos Depressão e Hidrocefalia também foram significativamente maiores do que o Grupo Controle.

A taxa de D-serina em relação a serina total também foi aumentada no Grupo Doença de Alzheimer em comparação com os outros grupos. O Grupo Depressão também apresentou taxas maiores de D-serina em relação a serina total em relação ao grupo controle.

Os níveis totais de serina também foram maiores nos Grupos Doença de Alzheimer e Depressão em comparação aos outros grupos.

Com relação ao parâmetro MEEM, Tabelas 1 e 2, este foi significativamente menor no Grupo Doença de Alzheimer em comparação com os outros grupos. Assim, os níveis individuais de D-serina foram significativamente e negativamente associados ao resultado do MEEM ( $r^2=0,49$ ,  $p<0,0001$ ).

Exemplo 2: Análise do efeito de medicamentos sobre o nível de D-serina em pacientes com provável doença de Alzheimer.

Como discriminado na Tabela 2, o grupo de pacientes diagnosticados com provável doença de Alzheimer foi composto por indivíduos, em sua maioria, sob terapia medicamentosa.

A medicação psicotrópica utilizada nos pacientes era rivastigmina (47,6%,  $n = 10$ ), risperidona (38,1%,  $n = 8$ ), memantina (28,6%,  $n = 6$ ), donepezil (23,8%,  $n = 5$ ), clonazepam (19,0%,  $n = 4$ ), citalopram (4,8%,  $n = 1$ ), trazodona (4,8%,  $n = 1$ ), biperideno (4,8%,  $n = 1$ ), escitalopram (4,8%,  $n = 1$ ), e mirtazapina (4,8%,  $n = 1$ ). Dois pacientes (9,5%) diagnosticados com doença de Alzheimer não estavam tomando nenhuma medicação.

Os níveis de D-serina foram comparados entre pacientes tomando ou não medicação, como consta na Tabela 4.

Tabela 4 – Comparação dos níveis de D-serina entre pacientes diagnosticados com Alzheimer, tomando medicação ou não.

D-serina ( $\mu\text{mol/l}$ )	Rivastigmina		Memantina		Risperidona		Clonazepam		Donepezil	
	No (N=11)	Yes (N=10)	No (N=15)	Yes (N=6)	No (N=13)	Yes (N=8)	No (N=17)	Yes (N=4)	No (N=16)	Yes (N=5)
DA	12.5 (1.84)	11.9 (1.74)	12.1 (1.82)	12.5 (1.80)	12.4 (1.71)	11.9 (1.94)	12.4 (1.76)	11.4 (1.89)	12.1 (1.78)	12.6 (1.91)
Test-t (valor de p)	0.80 (0.43)		-0.45 (0.65)		0.71 (0.48)		0.97 (0.34)		-0.50 (0.62)	

Nenhum dos medicamentos mostrou efeito significativo nos níveis de D-serina.

#### Exemplo 3: Correlação dos níveis de D-serina e CDR

Do que se depreende da Tabela 2 apresentada no Exemplo 1, os indivíduos do Grupo Controle apresentaram CDR 0; os pacientes do Grupo  
 5 Doença de Alzheimer apresentaram CDR variando entre 1, 2 e 3; os pacientes do Grupo Depressão apresentaram CDR 0,5; os pacientes do Grupo Hidrocefalia apresentaram CDR 0.

Assim, o estudo procedeu com os grupos estratificados de acordo com o estágio clínico de demência utilizando CDR. Como pode ser observado na  
 10 Figura 2, o grupo com CDR 0 (sem demência) apresentou níveis de D-serina significativamente mais baixos em relação aos grupos com CDR 0,5, 1, 2 e 3.

#### Exemplo 4: Comparação entre IATI e os níveis de D-serina

O IATI, da sigla em inglês *INNOTEST amyloid tau index*, é um teste que combina os níveis de A $\beta$ 42 (amiloide beta 42) e T-tau (proteína tau total), e que  
 15 vem sendo apontado como biomarcador do líquido cefalorraquidiano que pode auxiliar no diagnóstico da Doença de Alzheimer. O IATI foi definido como  $A\beta 42 / (240 + 1.18 \cdot T\text{-tau})$ .

O resultado do IATI foi significativamente inferior em indivíduos acometidos pela Doença de Alzheimer em comparação com os outros três  
 20 grupos (Tabela 1). Assim, os níveis de D-serina foram significativamente e negativamente associados aos resultados do IATI ( $r^2 = -0,41$ ,  $p < 0,0001$ ).

Foi realizada uma comparação do resultado do IATI com os níveis de D-serina com relação à especificidade e sensibilidade dos dois testes no diagnóstico de indivíduos com provável doença de Alzheimer (Grupo 1 do  
 25 Exemplo 1). O IATI mostrou 89,3% de sensibilidade e 80,9% de especificidade, enquanto os teste da presente invenção, avaliando os níveis de D-serina, apresentou 92,9% de sensibilidade e 85,7% de especificidade (corte de 9,82  $\mu\text{mol/L}$ ).

Exemplo 5: Análise da contribuição de diferentes regiões cerebrais na  
 30 doença de Alzheimer

Foi analisada a contribuição de diferentes regiões cerebrais para as mudanças nos níveis de D-serina na doença de Alzheimer. Foram estudadas 3 regiões que são afetadas em diferentes estágios da doença: hipocampo, córtex parietal e córtex occipital.

- 5 Foram estudados 32 casos com um diagnóstico neuropatológico de doença de Alzheimer confirmado por neuropatologista experiente e 14 casos sem alterações neuropatológicas. Os casos foram divididos em 3 grupos:

Grupo Controle- casos sem demência e nenhuma neuropatologia.

- 10 Grupo CCL – pacientes com Comprometimento Cognitivo Leve com CDR 0,5 e neuropatologia compatível com o estágio inicial da doença de Alzheimer.

Grupo DA – constituído por casos com demência (CDR 1, 2 e 3) e neuropatologia da doença de Alzheimer.

- 15 As amostras de tecido *post-mortem* foram obtidas do Banco de Cérebros, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, após autópsia realizada pelo Serviço de Autópsia de São Paulo. A avaliação da Demência Clínica (CDR) foi determinada por entrevista validada conduzida pelo informante/cuidador (Morris, 1993; Ferreti et al, 2010).

- 20 O Grupo CCL devido à doença de Alzheimer incluiu 10 casos com CDR 0,5, enquanto o Grupo DA incluiu 22 casos com CDR 1, 2 ou 3.

As características gerais de cada grupo estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Características demográficas dos grupos submetidos à análise *post-mortem*.

	Controle	CCL	DA	Estatísticas
Idade, anos (faixa) <sup>‡</sup>	74.4 (11.6)	80.7 (6.4)	81.5 (4.7) <sup>a</sup>	3.61 (0.04)*
Sexo, masculino/feminino <sup>†</sup>	8/6	4/5	6/14	1.39 (0.24)
Intervalo Post-mortem, horas <sup>‡</sup>	14.7 (3.4)	15.7 (6.2)	14.0 (4.7)	0.48 (0.62)

- 25 Valores são apresentados como médias (desvio padrão). Significância estatística é dada por <sup>‡</sup> ANOVA de 1 via, F (valor p) e <sup>†</sup> teste  $\chi^2$  (valor p).

As características individuais de cada indivíduo encontram-se relacionadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Características de cada paciente cujo tecido cerebral post-mortem foi submetido a análise.

5

ID/Idade (anos)/Sexo	CDR	IMP (horas)	Diagnóstico neuropatológico	Comorbidade	Fumante	Região do cérebro estudada
C1/84/M	0	14,6	Controle	HAS, DC	fumante	H, P, O
C2/65/M	0	10,85	Controle	TDM	fumante	H, P, O
C3/74/M	0	10,82	Controle	DC	fumante	H, P
C4/95/M	0	15,33	Controle	HAS, IC	fumante	H, P, O
C5/89/M	0	14,17	Controle	HAS, DM, DC, IC, S	fumante	H, P, O
C6/82/F	0	14,83	Controle	HAS	não fumante	H, P, O
C7/81/M	0	9	Controle	DC, TDM	fumante	O
C8/61/F	0	14,66	Controle	Ausente	não fumante	O
C9/75/F	0	12,58	Controle	HAS, DM, DC	não fumante	O
C10/59/F	0	14	Controle	IC, AVE	fumante	O
C11/60/F	0	20,42	Controle	HAS, DM, DC	fumante	H
C12/64/F	0	21,5	Controle	HAS	não fumante	H
C13/69/M	0	16,5	Controle	HAS, DM	fumante	H
C14/83/M	0	15,92	Controle	AVE	fumante	H
M1/82/F	0,5	14,47	DA + DP	HAS, DC	não fumante	H, P, O
M2/79/F	0,5	16,5	DA	HAS, DM, DC	não fumante	H, P, O
M3/86/M	0,5	17,83	DA	DC, IC, D	não fumante	H, P, O
M4/80/M	0,5	12,42	DA + DB	HAS	fumante	H, P, O
M5/73/F	0,5	14,5	DA + DAV	HAS, DC, IC, S	não fumante	H, P, O
M6/71/M	0,5	8,67	DA	HAS, IC	não fumante	H
M7/92/F	0,5	27,83	DA	Ausente	não fumante	H
M8/84/F	0,5	8,33	DA	HAS, DM, DC	não fumante	H
A1/89/F	1	24,72	DA + Dpi	HAS, DM, IC	fumante	H, P, O
A2/84/F	1	23,18	DA + DB + DP	AVE	fumante	H, P, O
A3/69/M	1	7,43	DA	HAS, DM, DC	fumante	H, P, O
A4/85/M	1	14,3	DA	HAS, DM, DC	fumante	H
A5/82/F	2	13,5	DA	HAS, AVE	não fumante	H, P, O
A6/72/M	2	7,78	DA	HAS, DM, AVE	fumante	H, P, O
A7/81/F	2	13,88	DA	DAH, DM, DC, AVE	não fumante	H, O
A8/83/F	3	10,77	DA	Ausente	não fumante	H, P, O
A9/77/F	3	10,83	DA	Ausente	não fumante	H, P, O
A10/80/F	3	8,33	DA	HAS, DC, D	fumante	O
A11/81/F	3	15,92	DA + Dpi	DC	não fumante	O
A12/84/M	3	12,33	DA	HAS, AVE	fumante	H, P, O
A13/80/F	3	8,08	DA + DB	HAS, AVE	fumante	O
A14/83/F	3	12,05	DA	Ausente	não fumante	H, P, O
A15/84/F	3	12,92	DA	HAS	não fumante	H
A16/82/M	3	15,33	DA	DM, DC	fumante	H
A17/81/F	3	10,67	DA	Ausente	não fumante	H
A18/86/F	3	17,08	DA	HAS, DM, AVE	não fumante	H
A19/87/F	3	17,72	DA	Ausente	não fumante	H
A20/80/M	3	18,6	DA	IC	não fumante	H

INP, Inventário Neuropsiquiátrico; IMP, intervalo post-mortem, H, Hipocampo, P, córtex parietal; O, córtex occipital; HAS, Hipertensão Arterial Sistêmica; DM Diabetes Mellitus; DC, doença coronariana; TDM, Transtorno Depressivo Maior; IC, Insuficiência Cardíaca; AVE, acidente vascular encefálico; D, Dislipidemia; EAP, edema agudo de pulmão; AAR, aneurisma



de aorta roto; IAM, Infarto Agudo do Miocárdio; TP, Tromboembolismo Pulmonar; P, Pneumonia, CP; cancer de pâncreas; HP, hemopericárdio; DA, doença de Alzheimer; DB, doença de Braak; DP, doença de Parkinson; DAV, doença amilóide vascular; DPI, doença pulmonar intersticial.

5

O tecido post-mortem foi homogeneizado em tampão contendo 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM EDTA e coquetel de inibidores de protease ("Roche complete mini"). Os níveis de aminoácidos (D-serina e L-serina) foram analisados no homogeneizado de tecido por HPLC.

10

Os resultados obtidos encontram-se relacionados na Tabela 7.

Tabela 7 – Aminoácidos em amostras de tecido cerebral *post-mortem*.

	Controle	CCL	DA	ANOVA F (valor p)
<b>Hipocampo</b>				
D-serina (μmol/l)	21.2 (18.3)	49.3 (17.6) <sup>a</sup>	33.4 (18.6)	6.77 (0.004)*
L-serina (μmol/l)	1306 (619)	1152 (820)	989 (613)	0.70 (0.51)
Serina total (μmol/l)	1327 (601)	1207 (831)	1117 (771)	0.24 (0.79)
Taxa D-ser/serina total	0.026 (0.027)	0.061 (0.033)	0.043 (0.022)	3.18 (0.06)
<b>Córtex Parietal</b>				
D-serina (μmol/l)	12.0 (3.94)	28.9 (9.62)	36.0 (16.68) <sup>b</sup>	6.64 (0.007)*
L-serina (μmol/l)	2478 (1044)	3098 (722)	2383 (1109)	0.37 (0.70)
Serina total (μmol/l)	2490 (1043)	3121 (707)	2421 (1111)	0.36 (0.71)
Taxa D-ser/serina total	0.005 (0.003)	0.008 (0.007)	0.018 (0.012)	3.39 (0.07)
<b>Córtex Occipital</b>				
D-serina (μmol/l)	1.70 (0.74)	1.32 (1.33)	1.70 (0.99)	0.31 (0.74)
L-serina (μmol/l)	72.4 (21.6)	131.9 (42.7)	114.8 (64.7)	2.81 (0.08)
Serina total (μmol/l)	74.1 (21.9)	133.2 (42.6)	128.0 (82.8)	2.37 (0.11)
Taxa D-ser/serina total	0.024 (0.010)	0.010 (0.010)	0.019 (0.015)	1.82 (0.18)

Os valores da tabela 7 são apresentados como médias (desvio padrão).

15

Significância estatística é dada por análise de variância (ANOVA) seguido por ajuste Bonferroni para comparações múltiplas. Asteriscos indicam diferença significativa.

20

Da Tabela 7 depreende-se que os níveis de D-serina no Hipocampo foram significativamente maiores no Grupo CCL em comparação com o controle. No Córtex Parietal os níveis de D-serina foram significativamente

maiores no Grupo DA em comparação com o controle. Já no Córtex Occipital, os níveis de D-serina não foram significativamente diferentes entre os grupos. Tais conclusões também podem ser visualizadas na Figura 2.

5 Quanto aos níveis de L-serina, serina total e taxa D-serina/serina total, não foi observada diferença significativa entre os grupos analisados.

Dessa forma, o método da presente invenção que compreende a detecção da concentração de D-serina em líquido cefalorraquidiano possibilita diagnosticar e/ou medir o progresso de doenças associadas a distúrbios neurodegenerativos, como por exemplo doença de Alzheimer, de forma precisa e rápida, auxiliando no tratamento e agregando qualidade de vida durante o envelhecimento do paciente.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

### Reivindicações

## MÉTODO E KIT DE DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS ASSOCIADAS A DISTÚRBIOS NEURODEGENERATIVOS

- 5           1. Método de Diagnóstico de doenças associadas a distúrbios neurodegenerativos **caracterizado** por compreender detecção de concentração de D-Serina em líquido cefalorraquidiano.
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por adicionalmente compreender associação da concentração de D-Serina  
10 detectada a um valor da escala CDR.
3. Método, de acordo com as reivindicações 1 ou 2, **caracterizado** pelo líquido cefalorraquidiano ser coletado por punção lombar entre as vértebras L3 e L4 ou L4 e L5.
4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3,  
15 **caracterizado** pela detecção ser realizada por meio de cromatografia HPLC.
5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** por adicionalmente compreender nova detecção de concentração de D-Serina em líquido cefalorraquidiano em período t posterior e entre a primeira medição e segunda medição.
- 20           6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** por compreender adicionalmente pelo menos uma nova medição e pelo menos um novo estabelecimento de relação matemática entre a medição atual e pelo menos uma medição prévia.
7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6,  
25 **caracterizado** pela doença associada a distúrbios neurodegenerativos ser pelo menos uma dentre Doença de Parkinson, Doença de Huntington, Doença de Alzheimer, Depressão, Amnésia, Transtorno Obsessivo-Compulsivo, Degeneração Espinocerebelar, Esclerose lateral amiotrófica, Esclerose múltipla, Leucodistrofia, Doença de Machado Joseph, Doença de Pick,  
30 Acidente Vascular Encefálico, Epilepsia, Polineuropatia, Síndrome de Dor Crônica.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pela doença associada a distúrbios neurodegenerativos ser a doença de Alzheimer.

5 9. Kit de diagnóstico de doenças associadas a distúrbios neurodegenerativos, **caracterizado** por compreender pelo menos um meio de coleta de líquido cefalorraquidiano e pelo menos um meio de detecção de concentração de D-Serina.

10 10. Kit, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pela detecção de D-serina por metodologias de imunoensaio selecionadas do grupo consistindo de: testes imunoenzimáticos, testes quimioluminescentes, eletroquimioluminescentes, radioimunoensaios e combinações entre estes.

11. Kit, de acordo com as reivindicações 9 ou 10, **caracterizado** pelo teste imunoenzimático ser do tipo ELISA.

15 12. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, **caracterizado** por compreender adicionalmente um meio de associação da concentração de D-Serina detectada a um padrão CDR.

### Figuras

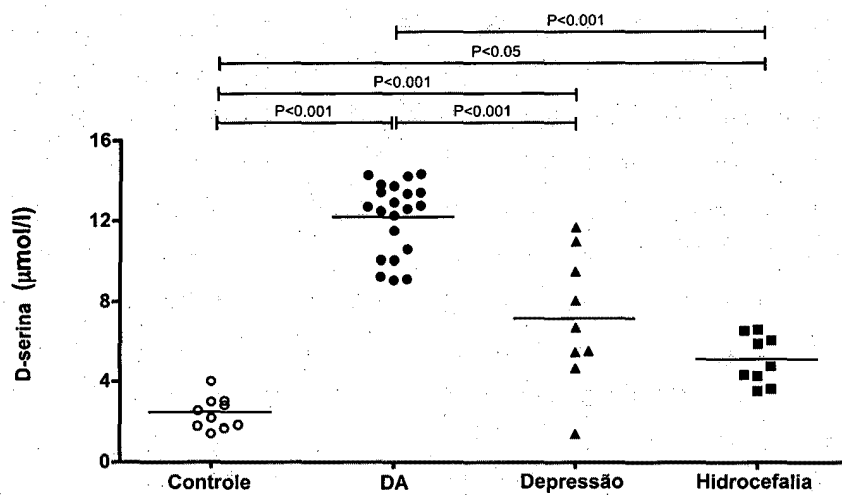


Figura 1

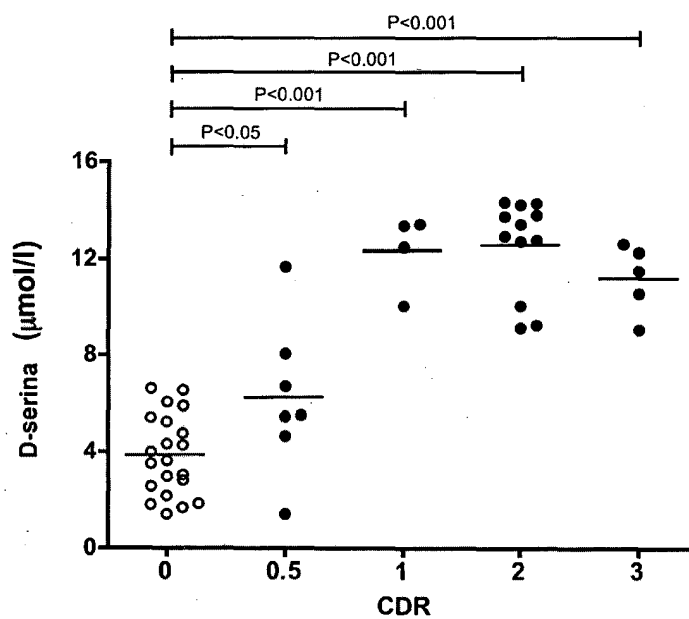


Figura 2

**Resumo****MÉTODO E KIT DE DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS ASSOCIADAS A DISTÚRBIOS  
NEURODEGENERATIVOS**

5           A invenção aqui descrita apresenta um novo método de diagnóstico e monitoramento da progressão de doenças neurodegenerativas, particularmente da doença de Alzheimer. O método se baseia na determinação de um novo biomarcador no líquido cefalorraquidiano de um paciente, a D-serina, que em determinados níveis caracteriza uma doença específica. É também objeto da  
10 presente invenção, um kit para diagnóstico de doenças associadas a distúrbios neurodegenerativos. A presente invenção se situa nos campos da química e biotecnologia.